

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 464 533 A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **91110307.5**

(51) Int. Cl.⁵: **C07K 15/06, C12N 15/62,
A61K 37/02, A61K 39/395**

(22) Anmeldetag: **22.06.91**

(30) Priorität: **28.06.90 DE 4020607**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
08.01.92 Patentblatt 92/02

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: **BEHRINGWERKE
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
W-3550 Marburg 1(DE)**

Anmelder: **THE GENERAL HOSPITAL
CORPORATION
Fruit Street (Bar-3)
Boston, MA 02114(US)**

(72) Erfinder: **Lauffer, Leander, Dr.
Walter-Voss-Weg 4
W-3550 Marburg(DE)**
Erfinder: **Oquendo, Patricia, Dr.
Walter-Voss-Weg 4
W-3550 Marburg(DE)**
Erfinder: **Zettlmeissl, Gerd, Dr.
Am Hofacker 15
W-3551 Lahntal-Grossfelden(DE)**
Erfinder: **Seed, Brian, Dr.
Fruit Street, Wellmann Bldg.
Boston, Massachusetts 02114(DE)**

(74) Vertreter: **Aulmich, Gerhard et al
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung
Postfach 80 03 20
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)**

(54) **Fusionsproteine mit Immunglobulinanteilen, ihre Herstellung und Verwendung.**

(57) Die Erfindung betrifft gentechnisch erzeugte lösliche Fusionsproteine bestehend aus nicht zur Immunglobulinfamilie gehörigen humanen Proteinen oder Teilen davon und verschiedenen Anteilen der konstanten Region von Immunglobulinmolekülen. Die funktionellen Eigenschaften beider Fusionspartner bleiben überraschenderweise im Fusionsprotein erhalten.

EP 0 464 533 A1

Die Erfindung betrifft gentechnisch erzeugte lösliche Fusionsproteine bestehend aus nicht zur Immunglobulinfamilie gehörigen humanen Proteinen oder Teilen davon und verschiedenen Anteilen der konstanten Region von Immunglobulinmolekülen. Die funktionellen Eigenschaften beider Fusionspartner bleiben überraschenderweise im Fusionsprotein erhalten.

Aus der EP-A 0325 262 und der EP-A 0314 317 sind entsprechende Fusionsproteine bestehend aus verschiedenen Domänen des CD4-Membranproteins menschlicher T-Zellen und aus humanen IgG1-Anteilen bekannt. Einige dieser Fusionsproteine binden mit gleicher Affinität an das Glykoprotein gp120 des Humanen Immundefizienz-Virus wie das zellgebundene CD4 Molekül. Das CD4-Molekül gehört zur Immunglobulinfamilie und ist folglich bezüglich seiner Tertiärstruktur sehr ähnlich aufgebaut wie Immunglobulinmoleküle. Dies gilt auch für die α -Kette des T-Zell-Antigenrezeptors, für die solche Fusionen ebenfalls beschrieben wurden (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 84 (1987), 2937-2940). Aufgrund der sehr ähnlichen Domänenstruktur war deshalb in diesem Fall die Beibehaltung der biologischen Aktivität der beiden Fusionspartner im Fusionsprotein zu erwarten.

Die erfindungsgemäß vorzugsweise an den Aminoterminus der konstanten Region von Immunglobulin gekoppelten humanen Proteine gehören nicht zur Immunglobulinfamilie und sind folgenden Klassen zuzuordnen: (i) membranständige Proteine, deren extrazelluläre Domäne ganz oder teilweise in die Fusion eingebracht wird. Insbesondere sind dies Thromboplastin und Cytokin- und Wachstumsfaktorrezeptoren, wie die zellulären Rezeptoren für Interleukin-4, Interleukin-7, Tumor-Nekrose-Faktor, GM-CSF, G-CSF, Erythropoietin; (ii) nicht membran-ständige lösliche Proteine, die ganz oder teilweise in die Fusion eingebracht werden. Insbesondere sind dies Proteine von therapeutischem Interesse wie z.B. Erythropoietin und andere Cytokine und Wachstumsfaktoren.

Die Fusionsproteine können in bekannten pro- und eukaryontischen Expressionssystemen hergestellt werden, vorzugsweise jedoch in Säugerzellen (z.B. CHO-, COS-, BHK-Zellen).

Die erfindungsgemäßen Fusionsproteine sind aufgrund ihres Immunglobulinanteils mittels Affinitätschromatographie leicht zu reinigen und besitzen verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften in vivo.

In vielen Fällen ist der Fc-Teil im Fusionsprotein für den Einsatz in Therapie und Diagnostik durchaus vorteilhaft und führt so z.B. zu verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften (EP-A 0232 262). Andererseits wäre für manche Anwendungen die Möglichkeit einer Entfernung des Fc-Teils wünschenswert, nachdem das Fusionsprotein

auf die beschriebene vorteilhafte Art exprimiert, nachgewiesen und gereinigt wurde. Dies ist dann der Fall, wenn sich der Fc-Anteil für den Einsatz in Therapie und Diagnostik als hinderlich erweist, z.B. wenn das Fusionsprotein als Antigen für Immunisierungen dienen soll.

Es existieren verschiedene Proteasen, deren Verwendung für diesen Zweck als denkbar erscheint. Papain oder Pepsin werden beispielsweise für die Erzeugung von F(ab)-Fragmenten aus Immunglobulinen eingesetzt (Immunology, Hrsg. Roitt, I. et al., Gower Medical Publishing, London (1989)), jedoch spalten sie nicht sonderlich spezifisch. Der Blutgerinnungsfaktor Xa hingegen erkennt in einem Protein die relativ seltene Tetrapeptidsequenz Ile-Glu-Gly-Arg und führt eine hydrolytische Spaltung des Proteins nach dem Argininrest durch Spaltsequenzen, die das beschriebene Tetrapeptid enthalten, wurden zuerst von Nagai und Thogersen in ein Hybridprotein auf gentechnologischem Wege eingeführt (Nagai, K. und Thogersen, H.C., Nature, Bd. 309 (1984), 810-812). Diese Autoren konnten zeigen, daß die in E. coli exprimierten Proteine tatsächlich spezifisch von Faktor Xa gespalten werden. Aus Publikationen ist jedoch noch kein Beispiel bekannt, daß solche Proteine auch in eukaryotischen und insbesondere in Animalzellen exprimiert und nach ihrer Reinigung von Faktor Xa gespalten werden können. Eine Expression der erfindungsgemäßen Proteine in Animalzellen ist jedoch vorzuziehen, da nur in einem solchen Zellsystem die Sezernierung von z.B. normalerweise membranständige Rezeptoren als Fusionspartner unter Beibehaltung ihrer nativen Struktur und damit ihrer biologischen Aktivität zu erwarten ist. Sezernierung in den Zellkulturüberstand erleichtert die nachfolgende einfache Reinigung des Fusionsproteins.

Die Erfindung betrifft somit gentechnisch erzeugte lösliche Fusionsproteine bestehend aus nicht zur Immunglobulinfamilie gehörenden humanen Proteine oder Teilen davon und verschiedenen Anteilen der konstanten Regionen von schweren oder leichten Ketten von Immunglobulinen verschiedener Subklassen (IgG, IgM, IgA, IgE). Als Immunglobulin bevorzugt ist der konstante Teil der schweren Kette von humanem IgG, besonders bevorzugt von humanem IgG1, wobei die Fusion an den Hinge-Bereich erfolgt. In einer besonderen Ausführungsform ist der Fc-Teil durch eine miteinander gebaute mittels Faktor Xa spaltbare Spaltsequenz auf einfache Weise abtrennbar.

Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur gentechnischen Herstellung dieser Fusionsproteine sowie deren Verwendung für die Diagnostik und die Therapie.

Die Erfindung ist schließlich in weiteren Beispielen erläutert.

Beispiel 1: Thromboplastin-Fusionsproteine

Die Blutgerinnung ist ein Vorgang von zentraler Bedeutung im menschlichen Organismus. Entsprechend fein reguliert ist die Gerinnungskaskade, in der eine Vielzahl zellulärer Faktoren und Plasmaproteine zusammenwirken. Die Gesamtheit dieser Proteine (und deren Kofaktoren) wird als Gerinnungsfaktoren bezeichnet. Endprodukte der Gerinnungskaskade sind Thrombin, das die Aggregation von Blutplättchen (Platelets) induziert, und Fibrin, das den Plateletthrombus stabilisiert. Thrombin katalysiert die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen und wird selbst durch limitierte Proteolyse von Prothrombin gebildet. Für diesen Schritt ist aktivierter Faktor X (Faktor Xa) verantwortlich, der in Gegenwart von Faktor Va und Calciumionen an Plateletmembranen bindet und Prothrombin spaltet.

Zwei Wege existieren zur Aktivierung von Faktor X, der extrinsische und der intrinsische "pathway". Im intrinsischen "pathway" wird eine Serie von Faktoren durch Proteolyse aktiviert, um jeweils selbst aktive Proteasen zu bilden. Im extrinsischen "pathway" wird Thromboplastin (Tissue Factor) von verletzten Zellen verstärkt synthetisiert und aktiviert Faktor X, zusammen mit Faktor VIIa und Calciumionen. Früher wurde angenommen, daß sich die Aktivität von Thromboplastin auf diese Reaktion beschränkt. Jedoch greift der Thromboplastin/VIIa-Komplex auf der Ebene von Faktor IX ebenfalls aktivierend in den intrinsischen "pathway" ein. Ein Thromboplastin/VIIa-Komplex ist also einer der wichtigsten physiologischen Aktivatoren der Blutgerinnung.

Es ist daher vorstellbar, daß Thromboplastin, abgesehen von seiner Verwendung als Diagnostikum (s.u.), auch als Bestandteil von Therapeutika zur Behandlung angeborener oder erworbener Blutgerinnungsdefizienzen eingesetzt werden kann. Beispiele hierfür sind chronische Hämophilien verursacht durch einen Mangel an Faktoren VIII, IX oder XI oder auch akute Störungen der Blutgerinnung als Folge von z.B. Leber- oder Nierenerkrankungen. Auch nach chirurgischen Eingriffen wäre der Einsatz eines solchen Therapeutikums denkbar.

Thromboplastin ist ein integrales Membranprotein, das nicht zur Immunglobulinfamilie gehört. Thromboplastin-cDNA-Sequenzen sind von insgesamt vier Gruppen veröffentlicht worden (Fisher et al., *Thromb. Res.*, Bd. 48 (1987), 89-99; Morrissey et al., *Cell*, Bd. 50 (1987), 129-135; Scarpati et al., *Biochemistry*, Bd. 26 (1987), 5234-5238; Spicer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Bd. 84 (1987), 5148-5152). Die Thromboplastin-cDNA beinhaltet einen offenen Leserahmen, der für ein Polypeptid aus 295 Aminosäureresten kodiert, wovon die N-terminalen 32 Aminosäuren als Signalpeptid fungieren. Reifes Thromboplastin besteht aus 263 Amino-

säureresten und besitzt eine Drei-Domänen-Struktur: i) aminoterminaler extrazellulärer Domäne (219 Aminosäurereste); ii) Transmembranregion (23 Aminosäurereste); iii) cytoplasmatische Domäne (Carboxyterminus; 21 Aminosäurereste). In der extrazellulären Domäne existieren drei potentielle Stellen für N-Glykosylierung (Asn-X-Thr). Thromboplastin ist normalerweise glykosyliert, jedoch scheint die Glykosylierung nicht essentiell für die Aktivität des Proteins zu sein (Paborsky et al., *Biochemistry*, Bd. 28 (1989), 8072-8077).

Thromboplastin wird als Zusatz zu Plasmaproben in der Gerinnungsdiagnostik benötigt. Durch die einstufige Prothrombin-Gerinnungszeitbestimmung (z.B. Quick-Test) läßt sich der Gerinnungsstatus der untersuchten Person feststellen. Das für die Diagnostik erforderliche Thromboplastin wird gegenwärtig aus humanem Gewebe gewonnen, wobei das Herstellungsverfahren schwer standardisierbar ist, die Ausbeute niedrig liegt und erhebliche Mengen humanes Ausgangsmaterial (Plazenten) bereit gestellt werden müssen. Andererseits ist zu erwarten, daß auch die gentechnische Herstellung von nativem, membrangebundenem Thromboplastin, bedingt durch komplexe Reinigungsverfahren, problematisch sein wird. Diese Problematiken können durch die erfindungsgemäße Fusion an Immunglobulinanteile umgangen werden.

Die erfindungsgemäßen Thromboplastin-Fusionsproteine werden von Säugerzellen (z.B. CHO-, BHK-, COS-Zellen) ins Kulturmedium ausgeschleust, über Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose gereinigt und besitzen überraschend hohe Aktivität in der einstufigen Prothrombin-Gerinnungszeitbestimmung.

Klonierung von Thromboplastin-cDNA

Zur Klonierung der Thromboplastin-cDNA wurde die publizierte Sequenz von Scarpati et al., *Biochemistry*, Bd. 26 (1987), 5234-5238, benutzt. Hieraus wurden zwei Oligonukleotidsondenmoleküle (s. Fig.1) abgeleitet. Mit diesen beiden Sondenmolekülen wurde eine cDNA-Bank aus humaner Plazenta (Grundmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Bd. 83 (1986), 8024-8028) abgesucht.

Es wurden verschieden lange cDNA-Klone erhalten. Ein Klon, 2b-Apr5, der für das weitere Vorgehen verwendet wird, kodiert für die gleiche Aminosäuresequenz, wie die in Scarpati et al. beschriebene cDNA. In Fig. 2 ist die Gesamtsequenz des Klons 2b-Apr5 mit der daraus abgeleiteten Thromboplastin-Aminosäuresequenz dargestellt.

Konstruktion eines für Thromboplastin-Fusionsprotein kodierenden Hybridplasmids pTF1Fc.

Das Plasmid pCD4E gamma 1 (EP 0 325 262 A2; hinterlegt bei ATCC unter der Nummer No. 67610) dient zur Expression eines Fusionsproteins aus humanem CD4-Rezeptor und humanem IgG1. Die für die extrazelluläre Domäne von CD4 kodierende DNA-Sequenz wird aus diesem Plasmid mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI entfernt. Mit dem Enzym HindIII darf hierbei nur eine teilweise Spaltung durchgeführt werden, um nur bei einer der zwei in pCD4E gamma 1 enthaltenen HindIII-Stellen zu schneiden (Position 2198). Es liegt dann ein geöffneter Vektor vor, bei dem eine eukaryotische Transkriptionsregulationssequenz (Promotor) von der offenen HindIII-Stelle gefolgt wird. Die offene BamHI-Stelle liegt am Beginn der kodierenden Regionen für einen Pentapeptidlinker, gefolgt von den Hinge- und den CH2- und CH3-Domänen vom menschlichem IgG1. Der Leserahmen in der BamHI-Erkennungssequenz GGATCC ist dergestalt, daß GAT als Asparaginsäure translatiert wird. DNA-Amplifizierung mit thermostabiler DNA-Polymerase ermöglicht eine gegebene Sequenz so zu verändern, daß an eines oder beide Enden beliebige Sequenzen angefügt werden. Zwei Oligonukleotide wurden synthetisiert, die mit Sequenzen in der 5'-untranslatierten Region

(A: 5' GATCGAT-TAAGCTTCGGAACCCGCTCGATCTCGCCGCC 3') bzw. kodierenden Region

(B: 5' GCATATCTGGATCCCCGTAGAA-TATTTCTCTGAATCCCC 3') der Thromboplastin-cDNA hybridisieren können. Oligonukleotid A ist dabei teilweise homolog zur Sequenz des kodierenden Stranges, Oligonukleotid B ist teilweise homolog zum nicht-kodierenden Strang; vergl. Fig. 3.

Nach erfolgter Amplifizierung liegt also ein DNA-Fragment vor (827 bp), das (bezogen auf den kodierenden Strang) am 5'-Ende vor dem Beginn der kodierenden Sequenz eine HindIII-Stelle, am 3'-Ende nach den Kodons für die ersten drei Aminosäurereste der Transmembranregion eine BamHI-Stelle enthält. Der Leserahmen in der BamHI-Schnittstelle ist dergestalt, daß nach Ligierung mit der BamHI-Stelle in pCD4E gamma 1 eine Genfusion erreicht wird mit einem durchgehenden Leserahmen vom Initiationskodon der Thromboplastin-cDNA bis zum Stopkodon der schweren Kette des IgG1. Das erwünschte Fragment wurde erhalten und nach Behandlung mit HindIII und BamHI in den oben beschriebenen mit HindIII (partiell)/BamHI geschnittenen Vektor pCD4E gamma 1 ligiert. Das resultierende Plasmid erhielt den Namen pTF1Fc (Fig. 4).

Transfektion von pTF1Fc in Säugerzellen

Das durch das Plasmid pTF1Fc kodierte Fusionsprotein wird im folgenden als pTF1Fc be-

zeichnet. pTF1Fc wurde transient in COS-Zellen exprimiert. Hierzu wurden COS-Zellen mit Hilfe von DEAE-Dextran mit pTF1Fc transfiziert (EP A 0325 262).

Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen ergaben ca. 25% als Anteil transfizierter Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in serumfreies Medium überführt. Dieser Zellüberstand wurde nach weiteren drei Tagen geerntet.

Reinigung von pTF1Fc-Fusionsprotein aus Zellkulturüberständen

170 ml Überstand von transient transfizierten COS-Zellen wurden über Nacht in einem Batchprozeß bei 4°C mit 0,8 ml Protein-A-Sepharose in einer Säule gesammelt, mit 10 Volumen Waschpuffer gewaschen (50mM Tris-Puffer pH 8,6, 150mM NaCl) und mit Elutionspuffer (100mM Citronensäure: 100mM NaCitrat 93:7) in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Die ersten 9 Fraktionen wurden nach sofortiger Neutralisierung mit jeweils 0,1 ml 2M Tris-Puffer pH 8,6 vereinigt und das enthaltene Protein durch drei Zyklen Konzentration/Verdünnung im Amicon-Mikrokonzentrat (Centricon 30) in TNE-Puffer (50mM Tris-Puffer pH 7,4, 50mM NaCl, 1mM EDTA) überführt. Das so erhaltene pTF1Fc ist in der SDS-PAGE elektrophoretisch rein (U.K. Lämmli, Nature 227 (1970) 680-685). In Abwesenheit von Reduktionsmitteln verhält es sich in der SDS-PAGE wie ein Dimer (ca. 165 KDa).

Biologische Aktivität von gereinigtem TF1Fc in der Prothrombin-Gerinnungszeitbestimmung

TF1Fc-Fusionsprotein ist in niedrigen Konzentrationen (> 50 ng/ml) in der einstufigen Prothrombin-Gerinnungszeitbestimmung (Vinazzer, H. Gerinnungsphysiologie und Methoden im Blutgerinnungslabor (1979), Fisher Verlag, Stuttgart) aktiv. Die erzielten Gerinnungszeiten sind vergleichbar mit den Gerinnungszeiten, die mit Thromboplastin, das aus humaner Plazenta isoliert wurde, erhalten werden.

Beispiel 2: Interleukin-4-Rezeptor-Fusionsproteine

Interleukin-4 (IL-4) wird von T-Zellen synthetisiert und wurde ursprünglich als B-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet, da es B-Zell-Proliferation stimulieren kann. Es übt eine Vielzahl von Effekten auf diese Zellen aus. Insbesondere ist dies das Anregen der Synthese von Molekülen der Immunglobulinsubklassen IgG1 und IgE in aktivierten B-Zellen (Coffmann et al., Immunol. Rev., Bd. 102 (1988) 5). Darüber hinaus reguliert IL-4 auch die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und

anderen haematopoetischen Zellen. Es trägt somit zur Regulierung von allergischen und anderen immunologischen Reaktionen bei. IL-4 bindet mit hoher Affinität an einen spezifischen Rezeptor. Die cDNA, die für den humanen IL-4-Rezeptor kodiert, wurde isoliert (Idzerda et al., J.Exp.Med. Bd. 171 (1990) 861-873. Aus der Analyse der von der cDNA Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz geht hervor, daß der IL-4 Rezeptor aus insgesamt 825 Aminosäuren besteht, wobei die N-terminalen 25 Aminosäuren als Signalpeptid fungieren. Reifer humaner IL-4-Rezeptor besteht aus 800 Aminosäuren und besitzt wie Thromboplastin eine Dreidomänenstruktur: i) aminoterminal extrazelluläre Domäne (207 Aminosäuren); ii) Transmembranregion (24 Aminosäuren) und iii) cytoplasmatische Domäne (569 Aminosäuren). In der extrazellulären Domäne existieren sechs potentielle Stellen für N-Glykosylierung (Asn-X-Thr/Ser). IL-4-Rezeptor besitzt Homologien zum humanen IL-6-Rezeptor, zur β -Untereinheit des humanen IL-2-Rezeptors, zum Maus-Erythropoietin-Rezeptor und zum Ratten-Prolaktinrezeptor (Idzerda et al., a.a.o.). Es ist somit wie Thromboplastin kein Mitglied der Immunglobulinfamilie, sondern wird zusammen mit den aufgeführten homologen Proteinen zur neuen Familie der Haematopoietinrezeptoren gerechnet. Mitgliedern dieser Familie sind 4 Cysteinreste und eine sich in der Nähe der Transmembranregion befindliche konservierte Sequenz (Trp-Ser-X-Trp-Ser) in der extrazellulären Domäne gemeinsam.

Aufgrund der beschriebenen Funktion des IL-4/IL-4-Rezeptorsystems ist ein therapeutischer Einsatz einer rekombinanten Form des IL-4-Rezeptors zur Unterdrückung IL-4-vermittelter Immunreaktionen (z.B. Transplantationsabstoßungsreaktion, Autoimmunkrankheiten, allergische Reaktionen) möglich.

Die für eine Therapie erforderliche Substanzmenge machen eine gentechnische Herstellung solcher Moleküle notwendig. Erfindungsgemäß ist wegen der problemlosen Reinigung durch Affinitätschromatographie und der verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften die Synthese von löslichen Formen des IL-4-Rezeptors als Immunglobulininfusionsprotein besonders vorteilhaft.

Die IL-4-Rezeptor-Fusionsproteine werden von Säugerzellen (z.B. CHO-, BHK-, COS-Zellen) in das Kulturmedium ausgeschleust, über Affinitätschromatographie an Protein-A-Sepharose gereinigt und besitzen überraschenderweise identische funktionelle Eigenschaften wie die extrazelluläre Domäne des intakten membrangebundenen IL-4-Rezeptormoleküls.

Konstruktion eines für IL-4-Rezeptor-Fusionsproteinkodierenden Hybridplasmids pIL-4RFc.

Wird das Plasmid pCD4EGam1 mit XhoI und BamHI geschnitten, liegt ein geöffneter Vektor vor, bei dem die offene XhoI-Stelle "downstream" von der Promotersequenz liegt. Die offene BamHI-Stelle liegt am Beginn der kodierenden Regionen für einen Pentapeptidlinker, gefolgt von den Hinge- und den CH2- und CH3-Domänen vom menschlichem IgG1. Der Leserahmen in der BamHI-Erkennungssequenz GGATCC ist dergestalt, daß GAT als Asparaginsäure translatiert wird. DNA-Amplifizierung mit thermostabiler DNA-Polymerase ermöglicht eine gegebene Sequenz so zu verändern, daß an eines oder beide Enden beliebige Sequenzen angefügt werden. Zwei Oligonukleotide wurden synthetisiert, die mit Sequenzen in der 5'-untranslatierten Region

(A: 5' GATCCAGTACTCGAGAGA-GAAGCCGGGCGTGGTGGCTCATGC 3') bzw. kodierenden Region

(B: 5, CTATGACATGGATCCTGCTCGAAGGGCTCCCTGTAGGAGTTGTG 3') der IL-4-Rezeptor-cDNA, die kloniert im Vektor pDC302/T22-8 vorliegt (Idzerda et al., a.a.o.), hybridisieren können. Oligonukleotid A ist dabei teilweise homolog zur Sequenz des kodierenden Stranges, Oligonukleotid B ist teilweise homolog zum nicht-kodierenden Strang; vergl. Fig. 5. Nach erfolgter Amplifizierung mittels thermostabiler DNA-Polymerase liegt ein DNA-Fragment vor (836 bp), das bezogen auf den kodierenden Strang am 5'-Ende vor dem Beginn der kodierenden Sequenz eine XhoI-Stelle, am 3'-Ende vor dem letzten Kodon der extrazellulären Domäne eine BamHI-Stelle enthält. Der Leserahmen in der BamHI-Schnittstelle ist dergestalt, daß nach Ligierung mit der BamHI-Stelle in pCD4E gamma 1 eine Genfusion erreicht wird mit einem durchgehenden Leserahmen vom Initiationskodon der IL-4-Rezeptor-cDNA bis zum Stopkodon der schweren Kette des IgG1. Das erwünschte Fragment wurde erhalten und nach Behandlung mit XhoI und BamHI in den oben beschriebenen mit XhoI/BamHI geschnittenen Vektor pCD4E gamma 1 ligiert. Das resultierende Plasmid erhielt den Namen pIL4RFc (Fig. 6).

Transfektion von pIL4RFc in Säugerzellen

Das durch das Plasmid pIL4RFc kodierte Fusionsprotein wird im folgenden als pIL4RFc bezeichnet. pIL4RFc wurde transient in COS-Zellen exprimiert. Hierzu wurden COS-Zellen mit Hilfe von DEAE-Dextran mit pIL4RFc transfiziert (EP A 0325 262). Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen ergaben ca. 25% als Anteil transfizierter Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in serumfreies Medium überführt. Dieser Zellüberstand wurde nach weiteren drei Tagen geerntet.

Reinigung von IL4RFc-Fusionsprotein aus Zellkulturüberständen

500 ml Überstand von transient transfizierten COS-Zellen wurden über Nacht in einem Batchprozeß bei 4 °C mit 1,6 ml Protein-A-Sepharose in einer Säule gesammelt, mit 10 Volumen Waschpuffer gewaschen (50mM Tris-Puffer pH 8,6, 150mM NaCl) und mit Elutionspuffer (100mM Citronensäure: 100mM NaCitrat 93:7) in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Die ersten 9 Fraktionen wurden nach sofortiger Neutralisierung mit jeweils 0,1 ml 2M Tris-Puffer pH 8,6 vereinigt und das enthaltene Protein durch drei Zyklen Konzentration/Verdünnung im Amicon-Mikrokonzentrat (Centricon 30) in TNE-Puffer (50mM Tris-Puffer pH 7,4, 50mM NaCl, 1mM EDTA) überführt. Das so erhaltene IL4RFc ist in der SDS-PAGE elektrophoretisch rein (U.K. Lämmli, Nature 227 (1970) 680-685). In Abwesenheit von Reduktionsmitteln verhält es sich in der SDS-PAGE wie ein Dimer (ca. 150 KDa).

Biologische Aktivität von gereinigtem IL4RFc

IL4RFc-Protein bindet ¹²⁵I-radiomarkiertes IL-4 mit gleicher Affinität (KD = 0.5nM) wie membrangebundener, intakter IL-4-Rezeptor. Es hemmt die Proliferation der IL-4-abhängigen Zelllinie CTLLHuIL-4RI Klon D (Idzerda et al., a.a.O.) in Konzentrationen von 10-1000 ng/ml. Darüber hinaus eignet es sich hervorragend für die Entwicklung von IL-4-Bindungstests, da es über seinen Fc-Teil an mit z.B. Kaninchen-antihuman-IgG vorbebeschichtete Mikrotiterplatten gebunden werden kann und in dieser Form ebenfalls mit hoher Affinität seinen Liganden bindet.

Beispiel 3: Erythropoietin-Fusionsproteine

Reifes Erythropoietin (EPO) ist ein aus 166 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, das essentiell für die Entwicklung von Erythrozyten ist. Es stimuliert die Reifung und die terminale Differenzierung erythroider Vorläuferzellen. Die cDNA für humanes EPO wurde kloniert (EPA-0267 678) und kodiert für die 166 Aminosäuren des reifen EPO und ein für die Sezernierung essentielles Signalpeptid von 22 Aminosäuren. Mit Hilfe der cDNA kann rekombinantes funktionelles EPO in gentechnisch veränderten Säugerzellen hergestellt werden und zur Therapie von anämischen Erscheinungen verschiedenen Ursprungs (z.B. bei akuten Nierenversagen) klinisch eingesetzt werden.

Erfindungsgemäß ist wegen der problemlosen Reinigung und der verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften die Synthese von EPO als Immunglobulinfusionsprotein besonders vorteilhaft.

Konstruktion eines für Erythropoietin-Fusionsprotein kodierenden Hybridplasmids pEPOFc.

Diese Konstruktion erfolgte analog zu der im Beispiel 2 beschriebenen (Abschnitt: "Konstruktion eines für IL-4-Rezeptor-Fusionsprotein kodierenden Hybridplasmids pIL-4RFc"). Zwei Oligonukleotide wurden synthetisiert, die mit Sequenzen in der Nähe des Initiationskodons

(A: 5'GATCGATCTCGAGATGGGGGTGCACGAATGT-CCTGCCTGGCTGTGG 3') bzw. des Stopkodons

(B: 5'CTGGAATCGGATCCCCCTGTCCTGCAGGCCTCCC-CTGTGTACAGC 3') der im Vektor pCES klonierten EPO-cDNA (EP A 0267 678) hybridisieren können.

Oligonukleotid A ist dabei teilweise homolog zur Sequenz des kodierenden Stranges, Oligonukleotid B ist teilweise homolog zum nicht-kodierenden Strang; vergl. Fig. 7. Nach erfolgter Amplifizierung liegt mittels thermostabiler DNA-Polymerase ein DNA-Fragment vor (598 bp), das bezogen auf den kodierenden Strang am 5'-Ende vor dem Initiationskodon eine XhoI-Stelle enthält und in dem am 3'-Ende das Kodon für den vorletzten C-terminalen Aminosäurerest von EPO (Asp) in einer BamHI-Erkennungssequenz vorliegt. Der Leserahmen in der BamHI-Schnittstelle ist dergestalt, daß nach Ligierung mit der BamHI-Stelle in pCD4E gamma 1 eine Genfusion erreicht wird mit einem durchgehenden Leserahmen vom Initiationskodon der EPO-cDNA bis zum Stopkodon der schweren Kette des IgG1. Das erwünschte Fragment wurde erhalten und nach Behandlung mit XhoI und BamHI in den oben beschriebenen mit XhoI/BamHI geschnittenen Vektor pCD4E gamma 1 ligiert. Das resultierende Plasmid erhielt den Namen pEPOFc (Fig. 8).

Patentansprüche

1. Lösliche Fusionsproteine bestehend aus nicht zur Immunglobulinfamilie gehörigen humanen Proteinen oder Teilen davon und verschiedenen Anteilen von Immunglobulinmolekülen aller Subklassen.
2. Fusionsproteine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Immunglobulinanteil der konstante Teil der schweren Kette von humanem IgG ist.
3. Fusionsproteine nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Immunglobulinanteil der konstante Teil der schweren Kette von humanem IgG1 oder ein Protein-A-bindendes Fragment davon ist.
4. Fusionsproteine nach Anspruch 2 oder An-

spruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusion an die "Hinge"-Region erfolgt.

5. Fusionsproteine nach Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil eines Membranproteins oder Teilen davon ist.
6. Fusionsproteine nach Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von Thromboplastin oder Teilen davon ist.
7. Fusionsproteine nach Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil eines Cytokin- oder Wachstumsfaktor-Rezeptors oder Teilen davon ist.
8. Fusionsprotein nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von IL-4 Rezeptor oder Teilen davon ist.
9. Fusionsprotein nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von IL-7-Rezeptor oder Teilen davon ist.
10. Fusionsprotein nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor oder Teilen davon ist.
11. Fusionsprotein nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von G-CSF-Rezeptor oder Teilen davon ist.
12. Fusionsprotein nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von GM-CSF-Rezeptor oder Teilen davon ist.
13. Fusionsprotein nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von Erythropoietin-Rezeptor oder Teilen davon ist.
14. Fusionsprotein nach Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein ein nicht membranständiges lösliches Protein oder Teil davon ist.
15. Fusionsprotein nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein ein Cytokin- oder Wachstumsfak-

tor oder Teil davon ist.

16. Fusionsprotein nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein Erythropoietin oder Teil davon ist.
17. Fusionsprotein nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein GM-CSF oder G-CSF bzw. Teil davon ist.
18. Fusionsprotein nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein Interleukin IL-1 bis IL-8 bzw. Teil davon ist.
19. Fusionsprotein nach einem der vorausgehenden Ansprüche 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich eine Faktor Xa Spaltstelle zwischen dem Immunglobulinteil und dem Nicht-Immunglobulinteil insertiert ist.
20. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach einem der Ansprüche 1-19, dadurch gekennzeichnet, daß die für diese Konstrukte codierende DNA in ein Säugerzell-Expressionssystem eingebracht und nach Expression das gebildete Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie über den Immunglobulinanteil gereinigt wird.
21. Verwendung der Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1-19 zur Diagnostik.
22. Verwendung der Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1-19 zur Therapie.

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat: ES

1. Verfahren zur Herstellung löslicher Fusionsproteine bestehend aus nicht zur Immunglobulinfamilie gehörigen humanen Proteinen oder Teilen davon und verschiedenen Anteilen von Immunglobulinmolekülen aller Subklassen, dadurch gekennzeichnet, daß die für diese Konstrukte codierende DNA in ein pro- oder eukaryotisches, vorzugsweise Säugerzell-Expressionssystem eingebracht und nach Expression das gebildete Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie über den Immunglobulinanteil gereinigt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Immunglobulinanteil der konstante Teil der schweren Kette von humanem IgG ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Immunglobulinanteil der konstante Teil der schweren Kette von humanem IgG1 oder ein Protein-A-bindendes Fragment davon ist. 5
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusion an die "Hinge"-Region erfolgt. 10
5. Verfahren nach Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil eines Membranproteins oder Teilen davon ist. 15
6. Verfahren nach Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von Thromboplastin oder Teilen davon ist. 20
7. Verfahren nach Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil eines Cytokin- oder Wachstumsfaktor-Rezeptors oder Teilen davon ist. 25
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von IL-4 Rezeptor oder Teilen davon ist. 30
9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von IL-7-Rezeptor oder Teilen davon ist. 35
10. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor oder Teilen davon ist. 40
11. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von G-CSF-Rezeptor oder Teilen davon ist. 45
12. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von GM-CSF-Rezeptor oder Teilen davon ist. 50
13. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von Erythropoietin-Rezeptor oder Teilen davon ist. 55
14. Verfahren nach Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusio-

nierte Protein ein nicht membranständiges lösliches Protein oder Teil davon ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein ein Cytokin- oder Wachstumsfaktor oder Teil davon ist.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein Erythropoietin oder Teil davon ist.
17. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein GM-CSF oder G-CSF bzw. Teil davon ist.
18. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein Interleukin IL-1 bis IL-8 bzw. Teil davon ist.
19. Verfahren nach einem der vorausgehenden Ansprüche 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich eine Faktor Xa Spaltstelle zwischen dem Immunglobulinteil und dem Nicht-Immunglobulinteil insertiert ist.

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat: GR

1. Lösliche Fusionsproteine bestehend aus nicht zur Immunglobulinfamilie gehörigen humanen Proteinen oder Teilen davon und verschiedenen Anteilen von Immunglobulinmolekülen aller Subklassen.
2. Fusionsproteine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Immunglobulinanteil der konstante Teil der schweren Kette von humanem IgG ist.
3. Fusionsproteine nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Immunglobulinanteil der konstante Teil der schweren Kette von humanem IgG1 oder ein Protein-A-bindendes Fragment davon ist.
4. Fusionsproteine nach Anspruch 2 oder Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusion an die "Hinge"-Region erfolgt.
5. Fusionsproteine nach Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil eines Membranproteins oder Teilen davon ist.
6. Fusionsproteine nach Ansprüchen 1-4, dadurch

gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von Thromboplastin oder Teilen davon ist.

7. Fusionsproteine nach Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil eines Cytokin- oder Wachstumsfaktor-Rezeptors oder Teilen davon ist. 5
8. Fusionsprotein nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von IL-4 Rezeptor oder Teilen davon ist. 10
9. Fusionsprotein nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von IL-7-Rezeptor oder Teilen davon ist. 15
10. Fusionsprotein nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor oder Teilen davon ist. 20
11. Fusionsprotein nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von G-CSF-Rezeptor oder Teilen davon ist. 30
12. Fusionsprotein nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von GM-CSF-Rezeptor oder Teilen davon ist. 35
13. Fusionsprotein nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein der extrazelluläre Anteil von Erythropoietin-Rezeptor oder Teilen davon ist. 40
14. Fusionsprotein nach Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein ein nicht membranständiges lösliches Protein oder Teil davon ist. 45
15. Fusionsprotein nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein ein Cytokin- oder Wachstumsfaktor oder Teil davon ist. 50
16. Fusionsprotein nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein Erythropoietin oder Teil davon ist. 55
17. Fusionsprotein nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusio-

nierte Protein GM-CSF oder G-CSF bzw. Teil davon ist.

18. Fusionsprotein nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das an Immunglobulin fusionierte Protein Interleukin IL-1 bis IL-8 bzw. Teil davon ist.
19. Fusionsprotein nach einem der vorausgehenden Ansprüche 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich eine Faktor Xa Spaltstelle zwischen dem Immunglobulinteil und dem Nicht-Immunglobulinteil inseriert ist.
20. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach einem der Ansprüche 1-19, dadurch gekennzeichnet, daß die für diese Konstrukte codierende DNA in ein Säugerzell-Expressionssystem eingebracht und nach Expression das gebildete Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie über den Immunglobulinanteil gereinigt wird.
21. Verwendung der Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1-19 zur Diagnostik.

Fig. 1

```

121  GTCGCTCGGACGCTCCTGCTCGGCTGGGTCTTCGCCAGGTGGCCGGCGCTTCAGGCACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CAGCGAGCCTGCGAGGACGAGCCGACCCAGAAGCGGGTCCACCGGCCGCGAAGTCCGTGA
      <*****
      Oligonukleotid 1
  
```

```

181  ACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAATTTTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TGTTTATGACACCGTCGTATATTAAATTGAACCTTAGTTGATTAAAGTTCTGTAAAAC
*****|
  
```

=====

```

                                     Oligonukleotid 2
      |*****>
      AACTACTGTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTCCTCCCGAACAGTTAACCGGAAGAGTACA
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
      TTGATGACAAAGTCACAAGTTCGTCACTAAGGGAGGGCTTGTCATTGGCCTTCTCATGT
  
```

Fig. 2

10 30 50
 GCGGGGCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTCTCGGCGAAGGGC
 70 90 110
 CTCGCACTCCCTCTGGCCGGCCAGGGCGCCTTCAGCCCAACCTCCCAGCCCCACGGGC
 130 150 170
 GCCACGGAACCCGCTCGATCTCGCCGCAACTGGTAGACATGGAGACCCCTGCCTGGCCC
 MetGluThrProAlaTrpPro
 190 210 230
 CGGGTCCCGCGCCCGAGACCGCCGTCGCTCGGACGCTCCTGCTCGGCTGGGTCTTCGCC
 ArgValProArgProGluThrAlaValAlaArgThrLeuLeuLeuGlyTrpValPheAla
 250 270 290
 CAGGTGGCCGGCGCTTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAA
 GlnValAlaGlyAlaSerGlyThrThrAsnThrValAlaAlaTyrAsnLeuThrTrpLys
 310 330 350
 TCAACTAATTTCAAGACAATTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCATCAAGTCTACACT
 SerThrAsnPheLysThrIleLeuGluTrpGluProLysProValAsnGlnValTyrThr
 370 390 410
 GTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAGATTGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGACACA
 ValGlnIleSerThrLysSerGlyAspTrpLysSerLysCysPheTyrThrThrAspThr
 430 450 470
 GAGTGTGACCTACCGACGAGATTGTGAAGGATGTGAAGCAGACGTAATTGGCACGGGTC
 GluCysAspLeuThrAspGluIleValLysAspValLysGlnThrTyrLeuAlaArgVal
 490 510 530
 TTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGTTCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAG
 PheSerTyrProAlaGlyAsnValGluSerThrGlySerAlaGlyGluProLeuTyrGlu
 550 570 590
 AACTCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGACAGCCAACAATTCAGAGT
 AsnSerProGluPheThrProTyrLeuGluThrAsnLeuGlyGlnProThrIleGlnSer

Fig. 2 (Fortsetzung)

610	630	650
TTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACGGACTTTAGTCAGA		
PheGluGlnValGlyThrLysValAsnValThrValGluAspGluArgThrLeuValArg		
670	690	710
AGGAACAACACTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTGGCAAGGACTTAATTTATACACTT		
ArgAsnAsnThrPheLeuSerLeuArgAspValPheGlyLysAspLeuIleTyrThrLeu		
730	750	770
TATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAACTAATGAGTTT		
TyrTyrTrpLysSerSerSerSerGlyLysLysThrAlaLysThrAsnThrAsnGluPhe		
790	810	830
TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACACTACTGTTTCAGTGTTCAGCAGTGATTCCCTCC		
LeuIleAspValAspLysGlyGluAsnTyrCysPheSerValGlnAlaValIleProSer		
850	870	890
CGAACAGTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGG		
ArgThrValAsnArgLysSerThrAspSerProValGluCysMetGlyGlnGluLysGly		
910	930	950
GAATTCAGAGAAATATTCTACATCATTGGAGCTGTGGTATTTGTGGTCATCATCCTTGTC		
GluPheArgGluIlePheTyrIleIleGlyAlaValValPheValValIleIleLeuVal		
970	990	1010
ATCATCCTGGCTATATCTCTACACAAGTGTAGAAAGGCAGGAGTGGGGCAGAGCTGGAAG		
IleIleLeuAlaIleSerLeuHisLysCysArgLysAlaGlyValGlyGlnSerTrpLys		
1030	1050	1070
GAGAACTCCCCACTGAATGTTTCATAAAGGAAGCACTGTTGGAGCTACTGCAAATGCTAT		
GluAsnSerProLeuAsnValSer		
1090	1110	1130
ATTGCACTGTGACCGAGAACTTTTAAGAGGATAGAATACATGGAAACGCAAATGAGTATT		
1150	1170	1190
TCGGAGCATGAAGACCCTGGAGTTCAAAAACTCTTGATATGACCTGTTATTACCATTAG		

Fig. 2 (Fortsetzung)

1210	1230	1250
CATTCTGGTTTTGACATCAGCATTAGTCACCTTTGAAATGTAACGAATGGTACTACAACCA		
1270	1290	1310
ATTCCAAGTTTAAATTTTAAACACCATGGCACCTTTGCACATAACATGCTTTAGATTAT		
1330	1350	1370
ATATTCCGCACTTAAGGATTAACCAGGTCGTCCAAGCAAAACAAATGGGAAAATGTCTT		
1390	1410	1430
AAAAAATCCTGGGTGGACTTTTGAAAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTC		
1450	1470	1490
TTGCTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTAGCACGATCTCGGCTCACTTGACCCCTCCGT		
1510	1530	1550
CTCTCGGGTTCAAGCAATTGTCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGTGCGC		
1570	1590	1610
ACTACCAGCCAAAGCTAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCATCTTGGC		
1630	1650	1670
CAGGCTGGTCTTGAATTCCTGACCTCAGTGATCCACCCACCTTGGCCTCCCAAAGATGCT		
1690	1710	1730
AGTATTATGGGCGTGAACCACCATGCCAGCCGAAAAGCTTTTGAGGGGCTGACTTCAAT		
1750	1770	1790
CCATGTAGGAAAGTAAAATGGAAGGAAATTGGGTGCATTTCTAGGACTTTTCTAACATAT		
1810	1830	1850
GTCTATAATATAGTGTTAGGTTCTTTTTTTTTTTCAGGAATACATTTGGAAATTCAAAAC		
1870	1890	1910
AATTGGGCAAACTTTGTATTAATGTGTAAAGTGCAGGAGACATTGGTATTCTGGGCAGCT		

Fig. 2 (Fortsetzung)

1930	1950	1970
TCCTAATATGCTTTACAATCTGCACTTTAACTGACTTAAGTGGCATTAAACATTTGAGAG		
1990	2010	2030
CTAACTATATTTTTATAAGACTACTATACAAACTACAGAGTTTATGATTTAAGGTACTTA		
2050	2070	2090
AAGCTTCTATGGTTGACATTGTATATATAATTTTTTAAAAAGGTTTTCTATATGGGGAT		
2110	2130	2150
TTTCTATTTATGTAGGTAATATTGTTCTATTTGTATATATTGAGATAATTTATTTAATAT		
2170		
ACTTTAAATAAAGGTGACTGGGAATTGTT		

Fig. 3



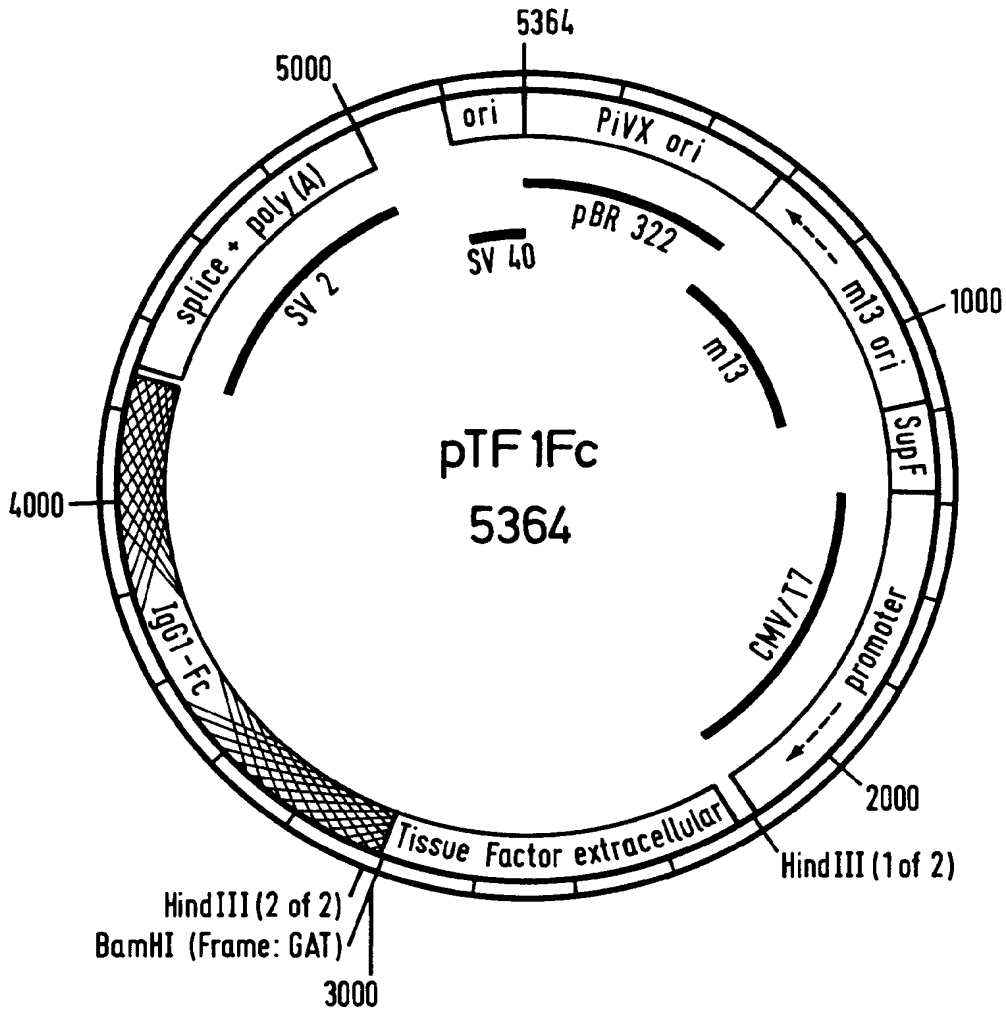


Fig. 4

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044

17

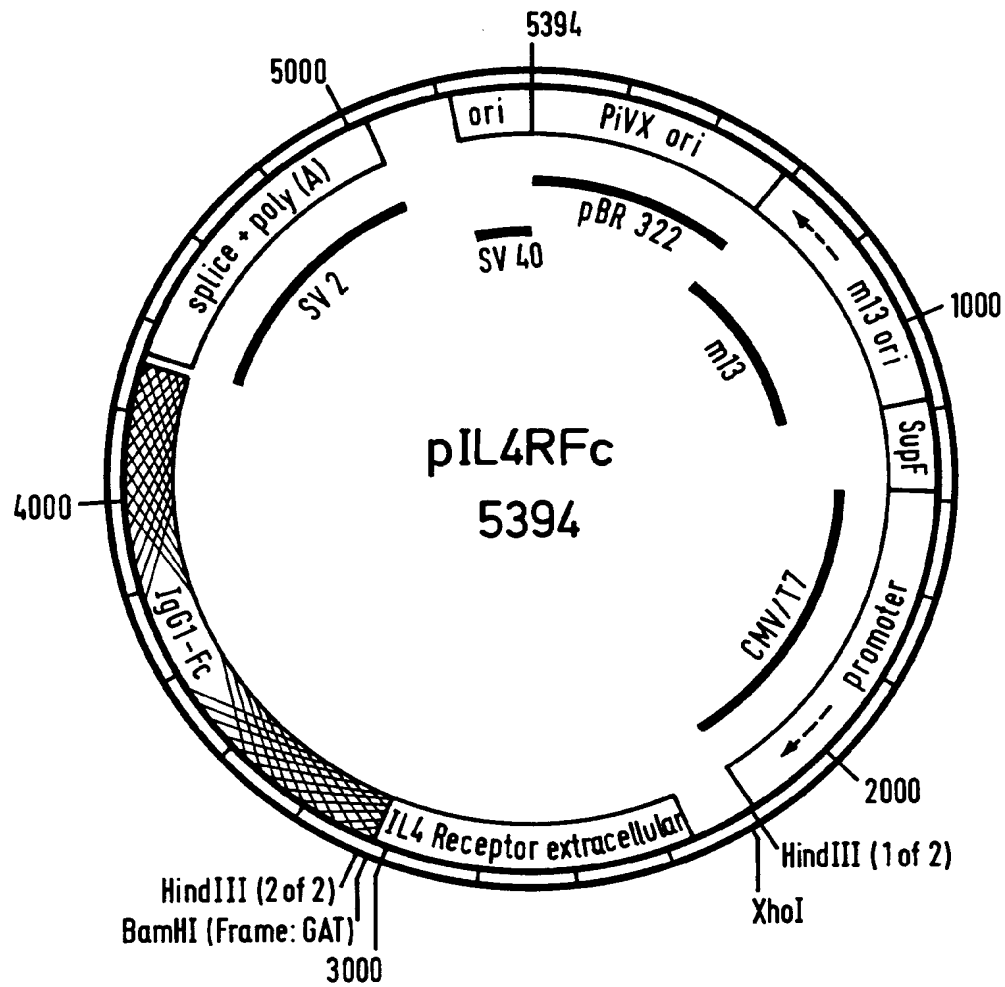


Fig. 6

Fig. 1

XhoI
 5' GATCGATCTCGAGATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGG 3' Oligonukleotid A
 -----|||||||||||||||||||||||||||||||||
 ATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTCG
 182 -----+-----+-----+-----+-----+----- 235
 TACCCACGTCCTTACAGGACGGACCGACACCGAAGAGGACAGGGACGACAGC

 MetGlyValHisGluCysProAlaTrpLeuTrpLeuLeuLeuSerLeuLeuSer -

 Beginn Leserahmen (Signalpeptid)

=====

Ende Leserahmen-----|
 LeuTyrThrGlyGluAlaCysArgThrGlyAspArgEnd
 -----|
 GCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGACCAGGTGTGTCCACCTGGGC
 724 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 783
 CGACATGTGTCCCCTCCGGACGTCCTGTCCCCTGTCTACTGGTCCACACAGGTGGACCCG
 |||||||||||||||||||||||||||||||
 3' CGACATGTGTCCCCTCCGGACGTCCTGTCCCCTAGGCTAAGGTC 5' Oligonukleotid B

 BamHI

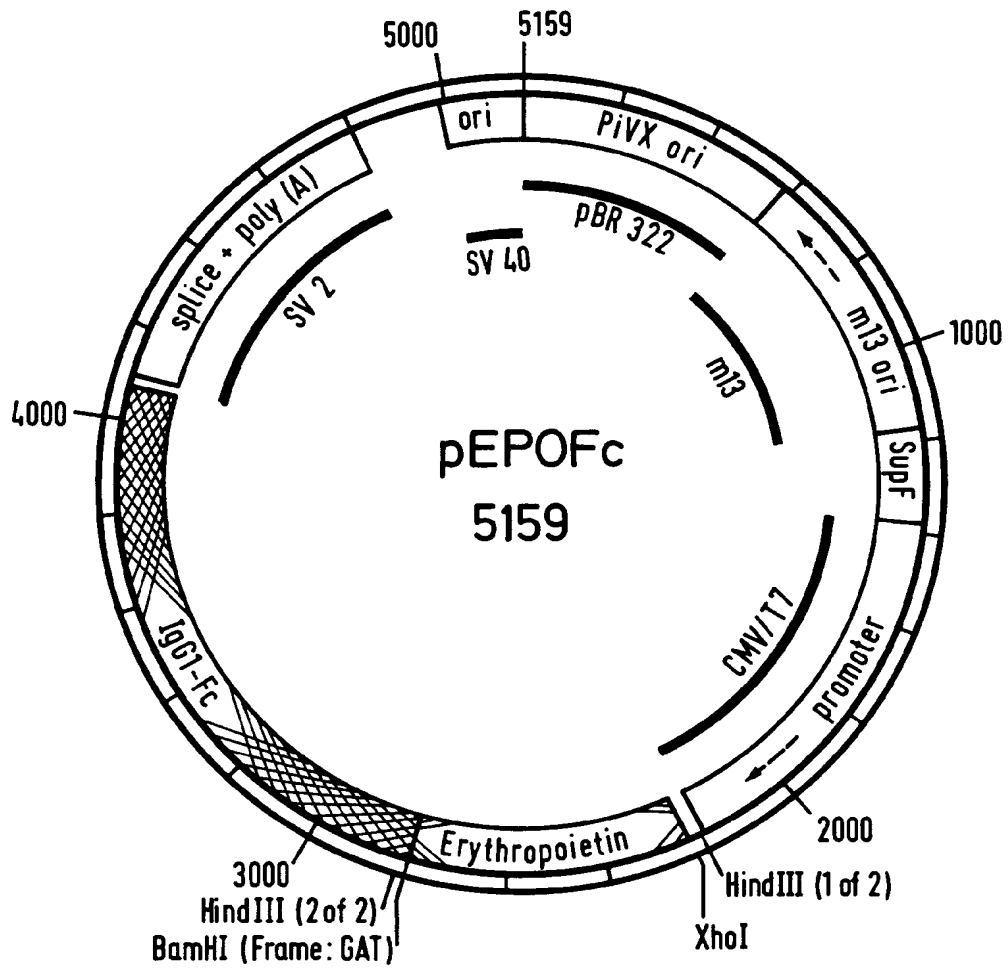


Fig. 8



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 91110307.5
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
Y	EP - A2 - 0 269 455 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) * Zusammenfassung; Ansprüche *	1-3, 20	C 07 K 15/06 C 12 N 15/62 A 61 K 37/02 A 61 K 39/395
D, Y	EP - A2 - 0 325 262 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) * Ansprüche 1, 3, 20, 23 *	1-3, 21	
P, A	EP - A2 - 0 414 178 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) * Ansprüche 8, 12, 14, 20 *	1-3	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.)
			C 07 K C 12 N A 61 K
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
WIEN		28-08-1991	AUGUSTIN
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet		E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie		D : in der Anmeldung angeführtes Dokument	
A : technologischer Hintergrund		L : aus andern Gründen angeführtes Dokument	
O : mündliche Offenbarung		& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
P : Zwischenliteratur			
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze			